

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



4

HU 00/66



REC'D 12 SEP 2000	
WIPO	PCT

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

**ELSŐBBSÉGI TANÚSÍTVÁNY**

Ügyszám: P9902352

A Magyar Szabadalmi Hivatal tanúsítja, hogy

Gyógyszerkutató Intézet Kft., Budapest,

Magyarországon

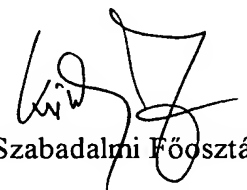
1999. 07. 12. napján 26550/99 iktatószám alatt,

Eljárás pravasztatin mikrobiológiai előállítására

című találmányt jelentett be szabadalmazásra.

Az idefűzött másolat a bejelentéssel egyidejűleg benyújtott melléklettel mindenben megegyezik.

Budapest, 2000. év 07. hó 19. napján

  
a Szabadalmi Főosztály vezetője

The Hungarian Patent Office certifies in this priority certificate that the said applicant(s) filed a patent application at the specified date under the indicated title, application number and registration number. The attached photocopy is a true copy of specification filed with the application.



**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

P99023

000000

ELSŐBBSÉGI PÉLDÁNY

1999 JÚL 12

Szolgálati találmány

Eljárás pravasztatin mikrobiológiai előállítására

Bejelentő: GYKI Kft., Budapest

Képviselő: Emri-Patent Kft., Debrecen

Feltalálók:

Jekkel Antalné dr.		40 %
Dr. Ambrus Gábor		8 %
Dr. Ilkőy Éva		8 %
Horváth Csabáné		7 %
Dr. Szabó István Mihály		5 %
Nagyné Szabó Zsuzsanna		5 %
Dr. Horváth Gyula		5 %
Mózesné Sütő Julianna		5 %
Barta István		4 %
Somogyi György		3 %
Salát János		2 %
	Budapest	
Kónya Attila		6 %
	Szolnok	
Boros Sándor		2 %
	Szöd	

A bejelentés napja: 1999. 07.

A találmány tárgya új eljárás a HMG-CoA reduktáz gátló pravasztatin mikrobiológiai előállítására.

A találmány közelebbről eljárás az (I) képletű vegyület mikrobiológiai előállítására valamely, a (II) képletű vegyület - ahol  $R^+$  jelentése alkálifém, vagy ammónium-ion - hidroxilezésére képes mikroorganizmus alkalmazásával, ahol

---

~~a mikroorganizmus a *Micromonospora* genusba tartozó prokariota szervezet~~

Az atherosclerosis és különösen a szív koszorúérelzáródás legnagyobb kockázati tényezője a vérplazma magas koleszterin szintje. Az elmúlt két évtizedben kiterjedten tanulmányozták a szervezetben végbemenő koleszterin bioszintézis sebességét meghatározó kulcsenzimet, a 3-hidroxi-3-metil-glutaril-koenzim A reduktázt (EC.-1.1.1.34.). A mevinolin és a vele rokonszerkezetű vegyületek, melyeket különböző gombafajok bioszintetizálnak, kompetitív inhibitorai ennek az enzimnek [A. Endo és munkatársai, J. Antibiot. **29**, 1346-1348 (1976); A. Endo és munkatársai, FEBS Lett. **72**, 323-326 (1976); C.H. Kuo és munkatársai, J. Org. Chem. **48**, 1991-1998 (1983)].

A pravasztatin szintén a HMG-CoA reduktáz enzim inhibitora. A pravasztatint M. Tanaka és munkatársai izolálták először (nem publikált eredmények) kutya vizeletéből, a kompaktin metabolizmusának tanulmányozása során [M. Arai és munkatársai, Sankyo Kenkyusyo Nenpo, **40**, 1-38 (1988)]. A pravasztatin (a kompaktinsav-nátriumsójának hidroxilezett terméke) legjellemzőbb tulajdonsága a szövetszelektivitás, mely abban nyilvánul meg, hogy a koleszterin szintézist erősen gátolja a májban és a vékonybélben, míg más szervekben ez az enzimgátló hatás csak alig mutatható ki. Igen kedvező továbbá, hogy a pravasztatinnak a többi, forgalomban lévő HMG-CoA reduktáz inhibitor gyógyszerekkel szemben alacsony a toxicitása.

Az ismert szabadalmi leírások szerint a kompaktin mikrobiológiai hidroxilezése pravasztatinná eltérő mértékű konverzióval valósítható meg különböző nemzetségekbe tartozó gomba fajokkal, valamint az Actinomycetales rendbe tartozó baktériumokkal, így a *Nocardia* és az *Actinomadura* genusba tartozó egyes fajokkal, továbbá számos, *Streptomyces* genusba tartozó fajjal, köztük előnyösen a *Streptomyces roseochromogenes* és *Streptomyces carbophilus* fajokkal (5,179,013; 4,448,979; 4,346,227 és a 4,537,859 számú Amerikai

Egyesült Államok-beli szabadalmi leírások, 58,010,572 számú japán szabadalmi leírás).

Köztudott, hogy a pravasztatin fonalas gombákkal történő előállításánál általánosan előforduló problémát okoz, hogy a kompaktin antifungális hatása miatt a tenyészethez adagolt kompaktin szubsztrátot csak alacsony koncentrációban képesek elviselni a mikroorganizmusok [N. Serizawa és munkatársai, J. Antibiotics, 36, 887-891 (1983)].

Ismeretes az is, hogy a *Streptomyces carbophilus* törzsnél japán kutatók *in vitro* DNS rekombinációval kísérelték meg a hidroxilezőképesség fejlesztését. A kompaktin pravasztatinná való hidroxilezéséhez citokróm P-450 monooxygenáz rendszer szükséges [T. Matsuoka és mtsi., Eur. J. Biochem. 184, 707-713, (1989)]. A szerzők szerint azonban a bakteriális citokróm P-450 monooxygenáz rendszerben, az elektrontranszportban nem egy, hanem több fehérje játszik szerepet, ami a rekombináns DNS-technika alkalmazását megnehezíti.

A találmány célja olyan új mikrobiológiai eljárás kidolgozása volt, amellyel a korábbi szabadalmi leírásokban megadottaknál előnyösebben lehet kompaktinból pravasztatint előállítani.

Mintegy 6000, Actinomycetales rendbe tartozó, mikroorganizmus törzsre kiterjedő szűrővizsgálatunk során olyan hidroxiláz enzimmel rendelkező prokariota mikroorganizmus törzseket kerestünk, amelyek felhasználásával a kompaktint magas koncentrációban alakíthatjuk pravasztatinná. A screening vizsgálat eredményeként 10 baktérium törzset választottunk ki, melyek a kompaktint 6 $\beta$ -helyzetben képesek hidroxilezni.

A taxonómiai vizsgálatok szerint a kiválasztott 10 törzsből 5 törzs *Streptomyces* genusba tartozó fajok képviselőjeként volt azonosítható. Nevezetesen:

*Streptomyces violaceus* No. 1/43 (Kämpfer et al., 1991)

*Streptomyces rochei* No. 1/41 (Berger et al., 1989)

*Streptomyces resistomycificus* No. 1/44 (Lindenbein, 1952)

*Streptomyces lanatus* (Frommer, 1959)

*Streptomyces* sp. No. 1/28

A további 5 törzsről pedig megállapítottuk, hogy a *Micromonospora* genusba sorolható.

Miután a *Micromonospora*-król mind ez idáig nem volt ismeretes az irodalomból, hogy képesek a kompaktin 6 $\beta$ -hidroxilezése révén pravasztatint előállítani, ezért behatóan tanulmányoztuk a *Micromonospora* genusba tartozó mikroorganizmusokat.

---

A *Micromonospora* genus az Actinomycetales rendbe sorolható.

A *Micromonospora* genusba (Ørskov, 1923) tartozó fajok jellemzői az alábbiak: A jól fejlett, elágazó és szeptált micélium átlagosan 0,5  $\mu$ m átmérővel rendelkezik. A mozgékonytságot nem mutató spórák magányosak, szesszilisek vagy rövid, ill. hosszú sporofórákon helyezkednek el, gyakran elágazó nyalábokban találhatók. A sporofórák elágazása általában monopodiális, ritkán szimpodiális. Légmicélium általában nincs, esetleg egyes tenyészetekben mint fehér vagy szürkés pszeudolégmicélium látható. A sejttal mezodiaminopimelinsavat és/vagy ennek 3-hidroxi származékait és glicint tartalmaz. A sejthidrolizátumokból xilóz és arabinóz mutatható ki. Jellemző foszfolipidek: foszfatidiletanolamin, foszfatidilinozit és foszfatidilinozit-mannozidok. A *Micromonospora* fajok aerob vagy mikroaerofil és kemoorganotróf szervezetek, melyek érzékenyek 6,0 alatti pH értékekre. 20-40°C közötti hőmérsékleten általában növekednek, de 50°C felett már növekedés nem tapasztalható. Típusfaj: *Micromonospora chalcea* (Foulerton, 1905), (Ørskov, 1923).

Az általunk kiválasztott 5, *Micromonospora* genusba tartozó törzs közül 4 törzset a beható taxonómiai vizsgálatok alapján ismert *Micromonospora* fajok képviselőiként azonosítottunk. Nevezetesen, az általunk *Micromonospora purpurea* No. IDR-P<sub>4</sub>-nek, illetve *Micromonospora echinospora* ssp. *echinospora* No. IDR-P<sub>5</sub>-nek, továbbá *Micromonospora rosaria* No. IDR-P<sub>7</sub>-nek jelölt izolátumok a Luedemann és Brodsky (1964) által leírt *M. purpurea*, illetve *M. echinospora*, valamint a Horan és Brodsky (1986) által leírt *M. rosaria* fajok képviselőinek, míg az általunk *Micromonospora megalomicea* ssp. *nigra* No. IDR-P<sub>6</sub>-nak jelölt izolátum a Weinstein és munkatársai (1969) által leírt *M. megalomicea* faj képviselőjének bizonyult. Míg a screening vizsgálataink során kiválasztott *Micromonospora* sp. No. IDR-P<sub>3</sub>-nak jelölt izolátum, - amely

0,1 g/liter kompaktinsav-nátriumsót 90 %-os hozammal volt képes pravasztatinná hidroxilezni - az elvégzett taxonómiai vizsgálatok alapján nem volt besorolható egyik ismert *Micromonospora* fajba sem.

Miután vizsgálataink szerint a *Micromonospora* genus egymástól rendszertanilag jelentősen különböző fajairól bizonyosodtunk meg, hogy képesek a kompaktin 6p-helyzetű hidroxilezésére, így a tulajdonságot a *Micromonospora* genus fajainak jellemző tulajdonságaként értékeljük.

Az általunk kiválasztott *Micromonospora* sp. IDR-P<sub>3</sub> jelű törzset NCAIM P (B) 001268, a *Micromonospora purpurea* IDR-P<sub>4</sub> jelű törzset NCAIM P (B) 001271, a *Micromonospora echinospora* ssp. *echinospora* IDR-P<sub>5</sub> jelű törzset NCAIM P (B) 001272, a *Micromonospora megalomicea* ssp. *nigra* IDR-P<sub>6</sub> jelű törzset NCAIM P (B) 001273 és a *Micromonospora rosaria* IDR-P<sub>7</sub> jelű törzset NCAIM P (B) 001274 számon letétbe helyeztük a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében.

A legjobb biokonverziós képességgel rendelkező *Micromonospora* sp. IDR-P<sub>3</sub> jelű törzs tenyészetében a pravasztatin főtermék mellett csak nagyon kis mennyiségben képződnek más vegyületek, ezért kiválóan alkalmas a pravasztatin ipari gyártására. Az általunk izolált új *Micromonospora* törzs diagnosztikai jellemzőit az alábbiakban foglalhatjuk össze.

#### **Az IDR-P<sub>3</sub> jelzésű *Micromonospora* törzs leírása**

##### *Mikromorfológiai tulajdonságok:*

A szubsztrátmicélium jól fejlett, inkább hajlott, mint egyenes lefutású fonalakból áll. Paránytenyészetekben a sporuláló hifák (sporofórák) monopodiális elágazása jól megfigyelhető. A magányos spórák gömbölyűek, kb. 1,8 µm átmérőjűek, elszórtan találhatóak a hifafonalak mentén, szesszilisek vagy rövid nyél végén helyezkednek el. Levestenyészetekben a sporuláló hifafonalakon spórákat megfigyelni alig lehet, mert az érett spórák gyorsan kiszabadulnak.

##### *Kulturális-morfológiai tulajdonságok:*

*Czapek-szacharóz agar:* Közepes növekedés, a vöröses kolóniák felszínén pontszerűen fekete sporuláló területek.



*Glükóz-aszparagin agar:* Megfelelő növekedés, pontszerű vagy összefüggő, kissé kiemelkedő, vörösesbarna vagy fekete kolóniák, vöröses oldódó pigment.

*Nutrient agar:* Megfelelő növekedés, összefüggő és kissé kiemelkedő, vörösesbarna, ill. fekete kolóniák. Vörösesbarna oldódó pigment.

*Élesztőkivonat-malátakivonat agar (ISP Med. 2):* Különálló, de jól fejlett, erősen kiemelkedő és gyűrt felszínű kolóniák, barna, ill. drapp színűek, néhol sporuláló

---

területekkel, valamint fehér vagy kissé szürkés pszeudogamicéliummal. Barnás vagy barnásvörös oldódó pigment.

*Anorganikus só-keményítő agar (ISP Med. 4):* Közepes növekedés, vörösesbarna, alig kiemelkedő, kissé gyűrt felszínű kolóniák. Gyér, vöröses oldódó pigment.

*Glicerín-aszparagin agar (ISP Med. 5):* Növekedés nyomokban, piszkosfehér vagy halvány narancsszínű, nem kiemelkedő kolóniák. Igen gyér, rózsaszínes oldódó pigment.

Az egyes táptalajokon megfigyelhető oldódó pigment részleges indikátorkarakterű: sav hatására sárga színű lesz, míg lúg hatására csak kissé változik, ekkor árnyalata sötétebb lesz.

#### *Szénforrás értékesítés:*

L-arabinózt, D-cellobiózt, D-fruktózt, D-glükózt, laktózt, D-maltózt, D-mannitot, D-mannózt,  $\alpha$ -metil-D-glükozidot, L-ramnózt, D-ribózt, D-szacharózt, D-trehalózt és D-xilózt jól értékesít, viszont az adonit, dulcit, mio-inozit, inulin, D-melicitóz, D-raffinóz szénforrásokat nem hasznosítja. D-galaktóz, glicerín, D-melibióz és szalicin jelenlétében a növekedés valamelyest jobb, mint a negatív kontrollon.

#### *Nitrogénforrás értékesítés:*

Élesztőkivonatot és NZ-Amine-t hasznosít, aszparagint, glutaminsavat,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -ot és  $\text{NaNO}_3$ -ot nem értékesít.

#### *Egyéb fiziológiai-biokémiai tulajdonságok:*

Keményítő, cellulóz bontása és tej emésztése erősen pozitív, nitrát-redukció negatív. Ferde burgonyaszeleten  $\text{CaCO}_3$  nélkül (pH 5,8-6,0) nem növekedik.

*Előfordulási helye:*

Az IDR-P<sub>3</sub> jelzésű *Micromonospora* törzset a Balaton fenéküledékéből vett iszap-mintából izoláltuk.

A fentiek alapján a találmány új, mikrobiológiai eljárás az (I) képletű vegyület előállítására valamely (II) általános képletű - ahol R<sup>+</sup> jelentése alkálifém, vagy ammónium-ion - vegyületből a (II) általános képletű vegyületet 6β-helyzetben hidroxilezni képes baktérium szülyesztett tenyészetével végzett aerob fermentációval és a biokonverzió során keletkező (I) képletű termék elkülönítése és tisztítása útján, amely abban áll, hogy a *Micromonospora* genus valamely, a (II) általános képletű vegyületet - ahol R<sup>+</sup> jelentése a fenti - 6β-helyzetben hidroxilező speciesének kiválasztott törzsét asszimilálható szén- és nitrogénforrásokat, valamint ásványi sókat tartalmazó táptalajon 25-32°C-on tenyésztjük, a kinőtt tenyészethez hozzáadagoljuk az átalakítandó szubsztrátot és a fermentációt a biokonverzió befejeződéséig folytatjuk, majd a keletkező (I) képletű vegyületet elkülönítjük a tenyészetből és kívánt esetben tisztítjuk.

A találmány oltalmi köre kiterjed a *Micromonospora* fajok vad típusú törzseire vagy bármely mutánsaira, amelyek képesek a kompaktin pravasztatinná történő biokonverziójára.

A találmány szerinti eljárásban a pravasztatin előállítására előnyösen az NCAIM P (B) 001268 számon letétbe helyezett *Micromonospora* sp. IDR-P<sub>3</sub> jelű, vagy az NCAIM P (B) 001271 számon letétbe helyezett *Micromonospora purpurea* IDR-P<sub>4</sub> jelű, vagy az NCAIM P (B) 001272 számon letétbe helyezett *Micromonospora echinospora* ssp. *echinospora* IDR-P<sub>5</sub> jelű, vagy az NCAIM P (B) 001273 számon letétbe helyezett a *Micromonospora megalomicea* ssp. *nigra* IDR-P<sub>6</sub> jelű, vagy az NCAIM P (B) 001274 számon letétbe helyezett *Micromonospora rosaria* IDR-P<sub>7</sub> jelű baktérium törzs vagy ezek valamely mutánsa tenyészetét használjuk.

Különösen előnyös az NCAIM P (B) 001268 számon letétbe helyezett *Micromonospora* sp. IDR-P<sub>3</sub> jelű baktérium törzsnek, vagy valamely mutánsának alkalmazása.

A találmány szerinti eljárás során előnyösen *in situ* fermentációt végzünk, azaz a hidroxilezési reakció aktívan növekedő mikroorganizmusok jelenlétében megy végbe.

A biokonverzió végezhető rázatott lombik tenyészetben vagy levegőztetett és kevertetett körülmények között úgy, hogy a (II) képletű vegyületet a növekedésben lévő tenyészethez adagoljuk, habzásgátló alkalmazásával egyidejűleg. ~~A mikroorganizmusok növekedéséhez optimális összetételű, szén- és nitrogénforrásokat, ásványi sókat és nyomelemeket tartalmazó táptalajokat használunk.~~

A kiválasztott prokariota törzsek asszimilálható szénforrásként különösen jól hasznosítják a glükózt, glicerint, dextrint, burgonya keményítőt, vízdoldható keményítőt, ramnózt, xilózt, szacharózt, stb. Asszimilálható nitrogénforrásként pedig a szójaliszt, kukoricaekvár, élesztőkivonat, pepton, húskivonat, ammónium-citrát, ammónium-szulfát, stb. alkalmazhatók. A pravasztatin termelésére szolgáló táptalajokban ásványi sóként kalcium-karbonát, nátrium-foszfátok, kálium-foszfátok lehetnek még jelen. A mikroorganizmusok növekedéséhez különösen előnyös táptalajok összetételét a példákban adjuk meg.

A biokonverziós folyamat fermentációs technológiával valósítható meg, ami lehet "batch tenyészet" vagy "fed-batch tenyészet". Különösen előnyös a kevertetett, folyékony, szubmerz tenyészet alkalmazása. A mikroorganizmusok tenyésztésére alkalmas hőmérséklet 25-37°C, de különösen előnyös a 25 és 32°C közötti tartomány.

A tenyészetek pH-ja 6,0 és 9,0 értékek között előnyös, de különösen alkalmas pH-tartomány a 7,0-8,5 értékek között van a biokonverzió során. A tenyészetek kevertetése 200-400 rpm között előnyös, de legelőnyösebb 250 rpm alkalmazása.

A találmány szerinti eljárás során a kompaktinsav-nátriumsó különböző koncentrációban alkalmazható, előnyösen 0,1 és 10 g/liter között, de 0,3-2,0 g/liter között alkalmazva a legelőnyösebb.

A találmány szerinti eljárásban *Micromonospora* törzsek alkalmazásával a kompaktin pravasztatinná történő átalakítása legalább 30 %-os biokonverzióval valósítható meg, de a legelőnyösebb esetben kb. 90 %-os átalakítás is elérhető.

Fermentáció közben a tenyészet hatóanyagtartalmát nagynyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel határozzuk meg. A fermentlé nagynyomású folyadékkromatográfiás analízisének etilalkohollal 2-szeresére hígított fermentlé minták centrifugált felülúszóját használjuk (készülék: Waters HPLC automata rendszer; oszloptöltet: Nucleosil C<sub>18</sub> 5  $\mu$  (BST) előtét kolonna; Waters Novapack C<sub>18</sub> 5  $\mu$  analitikai kolonna; oszlopméret: előtét kolonna: 40x4,6 mm; analitikai kolonna: 150x3,9 mm; mérés 236 nm-nél, eluensek: A-eluens: acetonitril - 0,1M vizes NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (25:75); B-eluens: acetonitril - víz (70:30); áramlási sebesség: 0,6-0,9 ml/perc lineáris gradienst használva a 100 % A eluenstől a 100 % B eluensig 10 perc; injektálási térfogat: 10  $\mu$ l. Retenciósidők: pravasztatinsav 10,6 perc, pravasztatín lakton 17,3 perc.

A biokonverzió során keletkezett pravasztatín a fermentléből bármely ismert módszerrel elkülöníthető.

A termék fermentléből való kinyerésére előnyös lehetőséget nyújt az a tény, hogy a pravasztatín sav-formában keletkezik a biokonverzió során és így a tenyészet szűrletéből anioncserélő gyanta oszlopon megkötve elkülöníthető. A termék izolálásához előnyösen polisztirol-divinil-benzol vázú kvaterner ammónium aktív csoportot hordozó, erősen bázikus anioncserélő gyantát, például Dowex AI 400 (OH<sup>-</sup>), Dowex 1x2 (OH<sup>-</sup>), Dowex 2x4 (OH<sup>-</sup>), AMBERLITE IRA 900 (OH<sup>-</sup>) gyantát alkalmazhatunk. A fermentlé szűrletéből a termék a hidroxil-ciklusú anioncserélő gyanta bekeverésével közvetlenül is megköthető. Az ioncserélő gyantán megkötött terméket ecetsavat vagy nátrium-kloridot tartalmazó aceton-víz eleggyel előnyösen 1 tömeg% nátrium-kloridot tartalmazó aceton - ionmentes víz (1:1) eleggyel eluáljuk az oszlopról. A pravasztatint tartalmazó frakciókat egyesítjük és az eluátumban lévő acetont vakuumban lepároljuk. A sűrítmény pH-ját 3,5-4,0 közé állítjuk 15 %-os kénsavval, majd a vizes oldatot etilacetáttal extraháljuk. Az etilacetátos extraktumból 1/10 és 1/20 térfogatú 5 %-os nátrium-hidrogén-karbonát oldattal vagy enyhén lúgos (pH 7,5-8,0) kémhatású vízzel vonhatjuk ki a pravasztatint. Kísérleteink során azt

tapasztaltuk, hogy a pravasztatin az így nyert alkalikus vizes kivonatból nem ionos adszorbens-gyantán történő oszlopkromatográfiával tiszta állapotban előállítható. Előnyösen úgy járhatunk el, hogy először a lúgos-vizes kivonatból a kivonatólás során beoldódott etilacetátot vakuum desztillációval eltávolítjuk és Diaion HP-20 gyantaoszlopra visszük fel a vizes kivonatot. Az oszlopon megkötődött pravasztatin-nátriumsót fokozatosan növekvő aceton tartalmú vizes oldatokkal eluálva kromatográfiásan tisztítjuk, a főként pravasztatint tartalmazó frakciókat egyesítjük és vakuumban besűrítjük. A sűrítményt aktív szénrel való derítés után liofilizáljuk és etanol - etilacetát elegyből kristályosítjuk. Így gyógyászati tisztaságú pravasztatinhoz jutunk.

A biokonverzió befejezése után a fermentléből vagy a baktérium sejtek elkülönítése után kapott szűrletből extrakcióval is kinyerhetjük a pravasztatint. A baktérium sejteket szűréssel vagy centrifugálással távolíthatjuk el, célszerű azonban, különösen ipari méretben, a teljes fermentlét extrahálni. Az extrakciót megelőzően a fermentlét, illetve a fermentlé szűrletet megsavanyítjuk 3,5-3,7 pH értékre ásványi savval, előnyösen híg kénsavval. Az extrakciót célszerűen az ecetsav 2-4-szénatomos alifás alkoholokkal képzett észtereivel, előnyösen etilacetáttal vagy izo-butilacetáttal végezzük. Az etilacetátos extraktumot vízzel mossuk, majd vízmentes nátrium-szulfáton szárítjuk. Ezt követően a pravasztatin sav-formájából lakton-származékot képzünk. A lakton-képzést a szárított etilacetátos oldatban végezzük szobahőmérsékleten, keverés közben katalitikus mennyiségű trifluor-ecetsavval előidézve a gyűrűzárást. Az átalakulást vékonyrétegkromatográfiás analízissel követjük. A laktonná alakulás befejeződése után az etilacetátos oldatot 5 tömeg%-os vizes nátrium-hidrogén-karbonát oldattal, majd vízzel mossuk, ezután vízmentes nátrium-szulfáton szárítjuk és vakuumban bepároljuk. A bepárlási maradékot szilikagél-oszlopkromatográfiával tisztítjuk, eluensként fokozatosan növekvő etilacetát tartalmú etilacetát - n-hexán elegyeket használva. Ezután a kromatográfiás tisztítással nyert pravasztatin-laktonból etanolos közegben ekvivalens mennyiségű nátrium-hidroxiddal hidrolizálva, szobahőmérsékleten pravasztatint állítunk elő. A pravasztatin képződés befejezése után a terméket acetonnal leválasztjuk. A kivált csapadékot szűrjük, acetonnal és n-hexánnal mossuk, majd vákuumban szárítjuk. Ezt követően etanol - etilacetát elegyből történő kristályosítással jutunk a kromatográfiásan tiszta pravasztatinhoz.

Megállapítottuk, hogy a Sephadex LH-gélen végzett kromatográfia is előnyösen alkalmazható a pravasztatin tisztítására, ezzel a módszerrel 99,5 %-nál tisztább pravasztatin is előállítható.

A pravasztatin fermentléből, vagy fermentlé szűrletből iparilag kivitelezhető műveletekkel egyszerűen és költségkímélő módon történő előállítása érdekében végzett kísérleteink során megállapítottuk, hogy az általunk izolált, a (II) általános képletű vegyületet 6 $\beta$ -helyzetben hidroxilező *Micromonospora* törzsek, köztük a *Micromonospora* sp. IDR-P<sub>3</sub> jelű törzs, fermentlevének vagy szűrletének szerves oldószeres extraktumából, előnyösen etilacetátos vagy izobutilacetátos kivonatából a sav-formában jelenlévő pravasztatin különböző szekunder aminokkal kristályos sóként leválasztható. A sóképzéshez alkil-, cikloalkil-, aralkil-, illetve aril-szubsztituenseket tartalmazó szekunder aminokat egyaránt alkalmasnak találtunk. Ezek közül célszerűen nem toxikus szekunder aminokat, például dioktil-amint, diciklohexil-amint, dibenzil-amint választottunk. A szerves szekunder amin só intermedier leválasztásánál, például a dibenzil-amin-só esetében, célszerűen úgy járunk el, hogy az extraktumhoz a pravasztatin tartalomra számítva 1,5 ekvivalens dibenzil-amint adagolunk, majd az extraktumot besűrítjük az eredeti térfogat 5 %-ára vakuum desztillálással, majd újabb 0,2 ekvivalens dibenzil-amint adunk a sűrítményhez. A koncentrátumból a kristályos dibenzil-amin-só leválik. Ezután a kristályos nyersterméket leszűrjük és vakuumban súlyállandóságig szárítjuk, majd metanolos vagy acetonos oldatban aktív szénnel derítjük. Ezt követően acetonos átkristályosítással jutunk a vékonyrétegekromatográfiás vizsgálat alapján egységes pravasztatinsav-dibenzil-amin-só intermedierhez.

A pravasztatin szerves szekunder amin sói nátrium-hidroxiddal vagy nátrium-alkohollal, például nátrium-etiláttal pravasztatinná alakíthatók.

A pravasztatin szekunder amin só intermedieren keresztül végzett izolálása egyszerűbb eljárás az eddig ismert izolálási technológiáknál. Az eljárás kivitelezése során műtermékek nem keletkeznek, a pravasztatin tisztítása a biokonverzió során keletkező melléktermékektől és a hidroxilezést végző mikroorganizmus által bioszintetizált különböző anyagcsere termékektől előnyösen megoldható.

A találmány szerinti eljárást az alábbi példákkal szemléltetjük:

### 1. példa

A *Micromonospora* sp. IDR-P<sub>3</sub> jelű, NCAIM P (B) 001268 letéti számú baktérium törzs 7-10 napos, vízdíszítő keményítő tartalmú (SM), ferde agar tenyészetéről 5 ml desztillált vízzel spóraszuszpenziót készítünk. Az így módon kapott spóraszuszpenzióval oltunk be 100 ml TI jelű inokulum táptalajt, melyet 500 ml-es Erlenmeyer lombikban mérve sterilizáltunk ki.

Az SM jelű agar táptalaj összetétele:

vízdíszítő keményítő	10,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
KCl	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
agar	15,0 g
1000 ml desztillált vízben.	

Az agar táptalaj pH-ját sterilizálás előtt 7,0 értékre állítjuk és 121°C-on 25 percig sterilizáljuk.

A TI-jelű inokulum táptalaj összetétele:

vízdíszítő keményítő	20,0 g
élesztőkivonat	10,0 g
1000 ml csapvízben.	

A táptalaj pH-ját sterilizálás előtt 7,0 értékre állítjuk és 121°C-on 25 percig sterilizáljuk.

Az inokulum tenyészetet síkrázógépen rázatjuk (250 rpm, 2,5 cm kitérés) 3 napon át, 32°C hőmérsékleten, majd ennek az inokulum tenyészetnek 5-5 ml-ével 10 db 500 ml-es Erlenmeyer lombikban sterilizált, 100-100 ml TT jelű, 121°C-on, 25 percig sterilizált biokonverziós táptalajt oltunk be.

A TT jelű biokonverziós táptalaj összetétele:

burgonyakeményítő	30,0 g
szójaliszt	30,0 g
CaCO <sub>3</sub>	5,0 g
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	2,0 mg
pálmaolaj	2,0 g

---

1000 ml csapvízben.

A táptalaj pH-ját sterilizés előtt 7,0 értékre állítjuk.

A fermentációt 32°C-on 72 órán át síkrázógépen rázatva végezzük, majd a tenyészethez lombikonként 50 mg kompaktinsav-nátriumsót adagolunk steril desztillált vízben oldva és a biokonverziót további 96 órán át folytatjuk. A kompaktinsav-nátriumsó pravasztatinná való átalakításának HPLC-vel meghatározott mértéke 82 %. A fermentáció befejezése után a tenyészeteket egyesítjük. Az így kapott fermentléből, mely HPLC módszerrel mérve 410 mg pravasztatint tartalmaz, a hatóanyagot izoláljuk. A pravasztatin kinyerésekor az alábbi módon járunk el. A fermentlevet 2500 fordulatszámon 20 percen át centrifugáljuk. A centrifugált fermentlevet és a baktérium sejteket elválasztjuk, majd a micéliumot 250 ml vízzel 1 órán át kevertetjük és végül leszűrjük. A centrifugált fermentlé és a szűrlet egyesítése után az oldat kémhatását 15 %-os kénsavval pH 4-re állítjuk és 3x300 ml etilacetáttal extraháljuk. Az egyesített etilacetátos extraktumot 300 ml vízzel mossuk, majd vízmentes nátrium-szulfáton szárítjuk és vákuumban 100 ml térfogatra koncentrálnak. Ezután a pravasztatin savból pravasztatin-laktont képezünk oly módon, hogy az etilacetátos extraktumhoz katalitikus mennyiségű trifluor-ecetsavat adunk keverés közben, szobahőmérsékleten. A pravasztatin-lakton képződését vékonyrétegekromatográfiás módszerrel követjük. Adsorbensként Kieselgel 60 F<sub>254</sub> DC (Merck) alufóliát, kifejlesztő oldószerkelegyként acetone - benzol - ecetsav (50:50:1,5) elegyet, előhívó reagensként foszformolibdén-sav reagenst (1,5 g foszformolibdén-sav + 40 ml metanol + 40 ml víz + 10 ml cc. kénsav) használunk. A pravasztatin-lakton R<sub>f</sub> értéke: 0,7. A laktonképződés befejezése után az etilacetátot kétszer 20 ml 5 %-os vizes nátrium-hidrogén-karbonát oldattal, majd 20 ml vízzel mossuk, vízmentes nátrium-szulfáton szárítjuk és vákuumban bepároljuk. A kapott 0,5 g bepárlási maradékot 10 g Kieselgel 60 adsorbensből készített oszlopon (oszlopátmérő: 1,2 cm, töltet magasság:



17 cm) kromatografáljuk. Eluáló oldószerkelegyként növekvő etilacetát tartalmú etilacetát - n-hexán elegyet használunk. A termék 60 % etilacetát - 40 % n-hexán eleggyel eluálódik az oszlopról. A terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük és vákuumban bepároljuk.

A pravasztatin-laktonból nátriumsót képzünk az alábbi módon:

a 230 mg terméket 5 ml etanolban oldjuk, majd 1M etanolos nátrium-hidroxid oldatból 110 mol% lúgoldatot adunk hozzá keverés közben. Fél óra keverés után az oldatot vákuumban kb. 2 ml-re koncentrálnak és a koncentrátumhoz 4 ml acetont adunk. A kapott csapadékos elegyet egy éjszakán át + 5°C-on állni hagyjuk. Ezután a csapadékot leszűrjük, 2 ml acetonnal és 2 ml n-hexánnal mossuk és vákuumban szárítjuk. Az így nyert 210 mg pravasztatint etanolban oldva aktív szénnel derítjük, majd etanol - etilacetát elegyből kristályosítjuk. Így 170 mg pravasztatint kapunk. Op: 168-171°C.

$[\alpha]_D^{20} = +156$  (c=0,5, víz).

A kapott termék spektroszkópiai jellemzői:

Ultraibolya spektrum (20 µg/ml-es metanolos oldat):  $\lambda_{\max}$  231, 237, 245 nm (logε = 4,263; 4,311; 4,136).

Infravörös szinkép (KBr):  $\nu_{OH}$  3415,  $\nu_{CH}$  2965,  $\nu_{C=O}$  1730,  $\nu_{COO^-}$  1575  $cm^{-1}$ .

$^1H$ -NMR spektrum ( $D_2O$  δ, ppm): 0,86 d, 3H (2-CH<sub>3</sub>); 5,92, dd, J = 10,0 és 5,4 Hz, 1H (3-H); 5,99, d, J = 10,0 Hz, 1H (4-H); 5,52, br, 1H (5-H); 4,24, m, 1H (6-H); 5,34, br, 1H (8-H); 4,06, m, 1H (β-H); 3,65, m, 1H (δ-H); 1,05, d, 3H (2'-CH<sub>3</sub>); 0,82, t, 3H (4'-H<sub>3</sub>).

$^{13}C$ -NMR spektrum ( $D_2O$ , δ, ppm): 15,3, q (2-CH<sub>3</sub>); 139,5, d (C-3); 129,5, d (C-4); 138,1, s, (C-4a); 127,7, d (C-5); 66,6, d (C-6); 70,1, d (C-8); 182,6, s (COO<sup>-</sup>); 72,6, d (C-β); 73,0, d (C-δ); 182,0, s (C-1') 18,8, q (2'-CH<sub>3</sub>); 13,7, q (C-4');

Pozitív FAB tömegspektrum (jellemző ionok): 469 [M+Na]<sup>+</sup>; 447 [M+H]<sup>+</sup>.

Negatív FAB tömegspektrum (jellemző ionok): 445 [M-H]<sup>-</sup>; 423 [M-Na]<sup>-</sup>; 101 [2-metil-vajsav - H]<sup>-</sup>.

## 2. példa

A 100-100 ml MT<sub>1</sub> jelű biokonverziós táptalajt tartalmazó 10 db 500 ml-es Erlenmeyer lombikot az 1. példában megadott módon készített inokulum tenyésztettel oltunk be és 28°C-on, 96 órán át inkubáljuk, majd lombikonként 50 mg kompaktinsav-nátriumsót adagolunk steril desztillált vízben oldva a tenyészetekhez. Ezt követően a hidroxilezést 72 órán át folytatjuk, majd újabb 50-50 mg steril desztillált vízben oldott szubsztrátot adagolunk a tenyészetekhez és a biokonverziót 72 órán át folytatjuk, majd a fermentleveket egyesítjük és a képződött pravasztatint kinyerjük.

Az MT<sub>1</sub> jelű biokonverziós táptalaj összetétele:

burgonyakeményítő	10,0 g
glükóz	20,0 g
szójaliszt	10,0 g
élesztőkivonat	10,0 g
CaCO <sub>3</sub>	5,0 g
napraforgóolaj	2,0 g
1000 ml csapvízben.	

A biokonverziós táptalaj pH-ját sterilizálás előtt 7,0 értékre állítjuk és 121°C-on 25 percig sterilizzuk.

Az egyesített fermentlevet, mely 750 mg pravasztatint tartalmaz, 2500 fordulatszámon 20 percen át centrifugáljuk. Az elválasztott baktérium sejteket 250 ml vízzel 1 órán át kevertetjük, majd leszűrjük. A kiülepített oldat és a szűrlet egyesítése után az oldat kémhatását 15 %-os kénsavval pH 3,5-4,0-re állítjuk, majd a savas szűrletet 3x300 ml etilacetáttal extraháljuk. Az etilacetátos oldathoz 150 mol% dibenzil-amint adunk, majd az oldatot vákuumban kb. 30 ml térfogatra koncentrálnak. Ezután újabb 20 mol% dibenzil-amint adunk az oldathoz. A csapadékos oldatot egy éjszakán át 0-5°C-on tartjuk, majd leszűrjük. A csapadékot hűtött etilacetáttal és n-hexánnal mossuk és vákuumban szárítjuk. A nyersterméket (1,1 g) 33 ml acetonnal oldjuk forráshőmérsékleten és 0,1 g aktív szénnel derítjük fél órán át. Ezt követően az elegyet leszűrjük, az aktív szenet 10 ml meleg acetonnal mossuk. A szűrletből kivált csapadékot forráshőmérsékleten újra oldatba visszük. Ezután az oldatot egy éjszakán át 0-5°C-on állni hagyjuk. A kivált kristályokat kiszűrjük, hűtött

acetonnal és n-hexánnal mossuk és vákuumban szárítjuk. Az így nyert 0,7 g pravasztatinsav-dibenzil-amin-sót felszuszpendáljuk 10 ml etanolban és 1M vizes nátrium-hidroxidból 110 mol% lúgoldatot adunk hozzá, majd az elegyet fél órán át szobahőmérsékleten kevertetjük. A sóképzés befejezése után az elegyhez 30 ml vizet adunk és az oldatot semlegesítjük, majd az etanolt vákuumban lepároljuk. A vizes koncentrátumot 50 ml Diaion HP-20 gyantából készített oszlopon (oszlopátmérő: 1,5 cm, töltetmagasság: 28 cm) kromatografáljuk. Eluáló elegyként 5 %-onként növekvő acetontartalmú acetont-ionmentes vizet elegyet használunk. A pravasztatin 15 % acetontartalmú acetont-ionmentes vizet eleggyel eluálódik az oszlopról. A frakciók pravasztatin tartalmát vékonyrétegekromatográfiás módszerrel analizáljuk az 1. példában megadott módszerrel. A pravasztatin  $R_f$  értéke: 0,5. A terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük és acetontartalmukat vákuumban bepároljuk, majd a vizes maradékot liofilizáljuk. Így módon 390 mg kromatográfiásan tiszta pravasztatint kapunk.

### 3. példa

Laboratóriumi fermentorban 121°C-on, 45 percen át sterilizált, 4,5 liter TT/2 jelű táptalajt, 500 ml - az 1. példában leírt módon készített - inokulum tenyésztettel oltunk be. A tenyésztést 32°C-on, 250 l/h steril levegőbevezetés mellett és 300 rpm kevertetéssel flat blade típusú keverőt alkalmazva folytatjuk. A fermentáció 3. napján 2,5 g kompaktinsav-nátriumsót adagolunk sterilre szűrt vizes oldatából. 48 óra elteltével a kompaktin-szubsztrát elfogy a tenyészetből. Ekkor újabb 2,5 g kompaktin-szubsztrátot adagolunk a tenyészetbe és további 24 órán át folytatjuk a biokonverziót, ez idő alatt a szubsztrát 90 %-os hozammal pravasztatinná alakul.

A TT/2 jelű biokonverziós táptalaj összetétele:

glükóz	75,0 g
vízoldható keményítő	50,0 g
szójaliszt	50,0 g
élesztő kivonat	50,0 g
pepton	5,0 g
NaNO <sub>3</sub>	20,0 g
CaCO <sub>3</sub>	25,0 g
1000 ml csapvízben.	

#### 4. példa

Laboratóriumi fermentorban 121°C-on, 45 percig sterilizált, 4,5 liter TT/1 jelű fermentációs táptalajt 500 ml, az 1. példában megadott módon készített inokulum tenyésztéssel oltunk be és 28°C-on tenyésztjük 200 l/h steril levegő átáramoltatás és 300 rpm kevertetéssel flat blade típusú keverőt alkalmazva.

---

A TT/1 jelű biokonverziós táptalaj összetétele:

glükóz	125,0 g
burgonyakeményítő	25,0 g
szójaliszt	50,0 g
élesztőkivonat (Gistex)	50,0 g
pepton	50,0 g
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	2,0 mg
napraforgóolaj	2,0 g
1000 ml csapvízben.	

A biokonverziós táptalaj pH-ját sterilizálás előtt 7,0 értékre állítjuk.

A fermentációt 28°C-on 96 órán át folytatjuk. Ekkor 2,5 g kompaktinsav-nátriumsót adagolunk sterilre szűrt vizes oldatából a tenyészetbe. A fermentáció 5. napjára a kompaktinsav-nátriumsó elfogy, azaz pravasztatinná alakul, ekkor további 2,5 g szubsztrátot adagolunk a tenyészetbe. 24 óra elteltével a második adag kompaktinsav-nátriumsó is elfogy. A 2,5 g kompaktin-szubsztrát adagolását az előzőekben leírt módon, 2,5 grammonként, további 2 napon át folytatjuk. A fermentáció befejezésekor 10 g szubsztrátból 9 g pravasztatin képződését mértük HPLC módszer alkalmazásával. A kompaktinsav-nátriumsó pravasztatinná való konverziójának mértéke 90 %. A fermentléből a hatóanyagot az alábbi módon nyerjük ki.

5 liter fermentléből, mely a fermentáció befejezésekor nyitott hidroxisav formában 1800 µg/ml pravasztatint tartalmaz, az alábbi módon izoláljuk a terméket:

A kapott 5 liter fermentlevet 2500 fordulatszámon 20 percen át üleptítjük. Az elválasztott baktérium sejtekhez 2 l vizet adunk és a micélium szuszpenziót

1 órán át kevertetjük, majd leszűrjük. A két szűrletet egyesítjük és 300 g (540 ml) Dowex Al 400 ( $\text{OH}^-$ ) gyantából készített oszlopon (oszlopátmérő: 4 cm, gyantaágy magasság: 43 cm) 500 ml/óra sebességgel átfolyatjuk, majd a gyantát 1 liter ionmentes vízzel mossuk. Ezután a gyantát 1 liter 10 g nátrium-kloridot tartalmazó acetón - ionmentes víz (1:1) eleggyel eluáljuk, 50 ml-es frakciókat szedve. Az eluátumot az első példában megadott vékonyrétegkromatográfiás módszerrel vizsgáljuk. A terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük és vákuumban az acetont lepároljuk. A vizes koncentrátum kémhatását 15 %-os kénsavval pH 3,5-4,0 értékre állítjuk és háromszor 250 ml etilacetáttal extraháljuk. Az egyesített etilacetátos extraktumhoz 40 ml ionmentes vizet adunk, majd a pH-t 1M nátrium-hidroxid oldattal 7,5-8,0 értékre állítjuk. A fázisokat 15 perc keverés után elválasztjuk, majd az etilacetátos extraktumot még kétszer 40 ml ionmentes víz jelenlétében pH 7,5-8,0 értéken kivonatoljuk. Az egyesített lúgos vizes oldatot vákuumban mintegy 50 ml térfogatra koncentrálnak. A koncentrátumot 600 ml DIAION HP-20 (Mitsubishi Co., Japán) gyantából készített oszlopra (oszlopátmérő: 3,8 cm, gyantaágy-magasság: 53 cm) visszük fel.

A gyantaoszlopot 600 ml ionmentes vízzel mossuk, majd ezt követően 5 %-onként növekvő acetón tartalmú acetón - ionmentes víz eleggyel eluáljuk. Az eluálás során 50 ml-es frakciókat szedünk, melyeket az 1. példában megadott vékonyrétegkromatográfiás módszerrel analizálunk. A pravasztatin 15 % acetón tartalmú acetón - ionmentes víz eleggyel eluálódik az oszlopról. A pravasztatint tartalmazó frakciókat egyesítjük és a kapott oldatot vákuumban kb. 150 ml térfogatra koncentrálnak. A koncentrált vizes oldathoz 0,6 g aktív szenet adva a pravasztatint 1 órán át szobahőmérsékleten derítjük, majd a szenet szűrőssel eltávolítjuk és a szűrletet liofilizáljuk. A 6,5 g liofilizált terméket etanol - etilacetát elegyből kétszer átkristályosítjuk. A kivált kristályos terméket leszűrjük és 20 ml etilacetáttal, majd 20 ml n-hexánnal mossuk és vákuumban szobahőmérsékleten szárítjuk. Így 4,6 g kromatográfiásan tiszta pravasztatint kapunk.

#### 5. példa

A kompaktint 6 $\beta$ -helyzetben hidroxilezni képes *Micromonospora echinospora* ssp. *echinospora* IDR-P<sub>5</sub> jelű NCAIM P (B) 001272 számú baktérium törzs vízdoldható keményítőt és ásványi sókat tartalmazó, az 1. példában leírt összetételű ferdeagaron növesztett, 10 napos tenyészetéről 5 ml steril desztillált vízzel spóraszuszpenziót készítünk és ezzel 500 ml-es Erlenmeyer-lombikban sterilizált, 100 ml TI jelű, az 1. példában megadott összetételű, inokulum táptalajt oltunk. A tenyészetet síkrázógépen (250 fordulat/perc, 2,5 cm kitérés) 3 napig, 28°C-on rázatjuk, majd a kapott inokulum tenyészet 5-5 ml-ével 500 ml-es Erlenmeyer lombikban, 25 percig, 121°C-on sterilizált 100-100 ml TT/1 jelű, a 3. példában megadott összetételű, biokonverziós táptalajt oltunk. A lombikokat 25°C-on síkrázógépen (250 fordulat/perc, 2,5 cm kitérés) 3 napig rázatjuk, majd a tenyészetekhez sterilre szűrt vizes oldatban 10-10 mg kompaktin-szubsztrátot (kompaktinsav-nátriumsó) adagolunk és a tenyésztést tovább folytatjuk. A fermentációt 168 óráig folytatjuk. A fermentlé hatóanyagtartalmát HPLC módszerrel határozzuk meg. A biokonverzió leállításakor a fermentlében a pravasztatin koncentráció átlagosan 40  $\mu$ g/ml.

#### 6. példa

A *Micromonospora megalomicea* ssp. *nigra* IDR-P<sub>6</sub> jelű, NCAIM P (B) 001273 letéti számú baktérium törzsszel az 5. példában leírt módon végezzük a fermentációt, a szubsztrát adagolását és a biokonverziót. A fermentlé hatóanyagtartalmát nagynyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel határozzuk meg. A biokonverzió leállásakor a fermentlében a pravasztatin koncentráció átlagosan 50  $\mu$ g/ml.

#### 7. példa

A *Micromonospora purpurea* IDR-P<sub>4</sub> jelű, NCAIM P (B) 001271 letéti számú baktérium törzsszel, az 1. példában leírt módon készített inokulum tenyészet 5-5 ml-ével 500 ml-es Erlenmeyer lombikban, 25 percig, 121°C-on sterilizált 100-100 ml TT/14 jelű táptalajt oltunk be.

A TT/14 jelű biokonverziós táptalaj összetétele:

burgonya keményítő	5,0 g
glükóz	25,0 g
élesztőkivonat (GISTEX)	15,0 g
pepton	15,0 g
CaCO <sub>3</sub>	1,0 g

---

1000 ml csapvízben.

A biokonverziós táptalaj pH-ját sterilizálás előtt 7,0 értékre állítjuk.

A lombikokat 25°C-on, síkrázógépen (250 fordulat/perc, 2,5 cm kitérés) 3 napig rázatjuk. A szubsztrát adagolását, a biokonverziót és a fermentáció hatóanyagtartalmának meghatározását az 5. példában leírt módon végezzük. A biokonverzió leállításakor a fermentációban a pravasztatin koncentráció átlagosan 40 µg/ml.

#### 8. példa

A *Micromonospora rosaria* IDR-P<sub>7</sub> jelű, NCAIM P (B) 001274 letéti számú baktérium törzsszel az 1. példában leírt módon végezzük a fermentációt, a szubsztrát adagolását és a biokonverziót. A biokonverzió leállításakor a fermentációban, nagynyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel mérve átlagosan 350 µg/ml a pravasztatin koncentráció.

Szabadalmi igénypontok

1. Mikrobiológiai eljárás az (I) képletű vegyület előállítására valamely (II) általános képletű - ahol  $R^+$  jelentése alkálifém, vagy ammónium-ion - vegyületből, a (II) általános képletű vegyületet  $6\beta$ -helyzetben hidroxilezni képes baktérium törzs sülyesztett tenyészetével végzett aerob fermentációval és a biokonverzió során keletkező (I) képletű termék elkülönítése és tisztítása

---

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM P (B) 001268 számon letétbe helyezett *Micromonospora* sp. IDR-P<sub>3</sub> jelű törzset, vagy ennek valamely, a (II) általános képletű vegyületet  $6\beta$ -helyzetben hidroxilezni képes mutánsát tenyésztjük.
3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM P (B) 001271 számon letétbe helyezett *Micromonospora purpurea* IDR-P<sub>4</sub> jelű törzset, vagy ennek valamely, a (II) általános képletű vegyületet  $6\beta$ -helyzetben hidroxilezni képes mutánsát tenyésztjük.
4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM P (B) 001272 számon letétbe helyezett *Micromonospora echinospora* ssp. *echinospora* IDR-P<sub>5</sub> jelű törzset, vagy ennek valamely, a (II) általános képletű vegyületet  $6\beta$ -helyzetben hidroxilezni képes mutánsát tenyésztjük.
5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM P (B) 001273 számon letétbe helyezett *Micromonospora megalomicea* ssp. *nigra* IDR-P<sub>6</sub>




jelű törzset, vagy ennek valamely, a (II) általános képletű vegyületet 6 $\beta$ -helyzetben hidroxilezni képes mutánsát tenyésztjük.

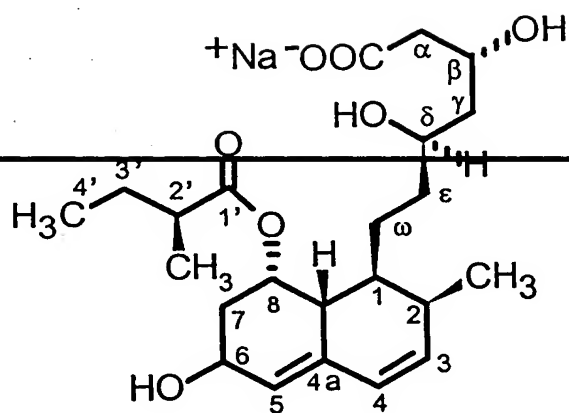
6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM P (B) 001274 számon letétbe helyezett *Micromonospora rosaria* IDR-P<sub>7</sub> jelű törzset, vagy ennek valamely, a (II) általános képletű vegyületet 6 $\beta$ -helyzetben hidroxilezni képes mutánsát tenyésztjük.

---

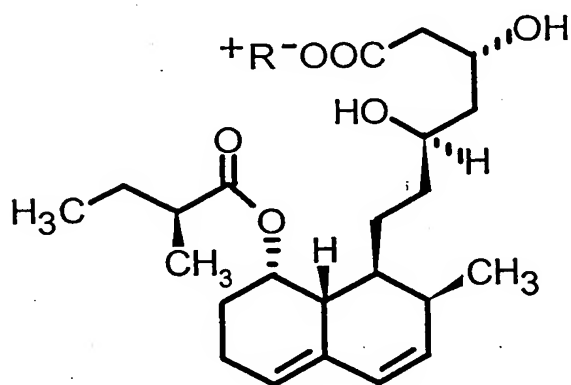
7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a biokonverzió során keletkező (I) képletű vegyületet anioncserélő gyantán való megkötéssel, vagy vízzel nem elegyedő oldószeres extrakcióval különítjük el a tenyészetből, majd laktonszármazékának vagy valamely szekunder amin sójának - mint intermedierek - előállításán keresztül, vagy a fermentlé szerves oldószeres extraktumából nyert alkalikus vizes kivonat nemionos adszorbens gyantán való kromatografálásával tisztítjuk és kívánt esetben átkristályosítjuk.

EMRI - PATENT KFT  
4032 Debrecen,  
Kartács u. 36.





(I)



(II)

3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100